

氏名	大 森 一 弘
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2 9 6 8 号
学位授与の日付	平 成 1 7 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts (高グルコース状態は歯肉線維芽細胞においてgp130- p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein シグナル伝達を介したIL-6誘導性 Vascular endothelial growth factor 165の発現を増強する)
論文審査委員	教授 滝川 正春 教授 北山 滋雄 教授 高柴 正悟

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

歯周炎は、腎症、網膜症、神経症、大血管障害、小血管障害に次ぐ糖尿病の第6番目の合併症と提唱されるに至り、全身疾患に対する歯周炎の影響を考察することが非常に重要である。糖尿病は歯周炎の増悪因子として認知されており、その背景は高血糖状態が歯周組織に発症した慢性炎症を悪化させるために起こる病態として理解されているがその詳細なメカニズムは不明である。

炎症性サイトカイン Interleukin-6 (IL-6) は歯周炎の進行に関与することで知られている。歯肉線維芽細胞 (GF) において IL-6 は可溶性 IL-6 レセプター (sIL-6R) と複合体を形成し、そのシグナル伝達サブユニットである gp130 のリン酸化を誘導する。gp130 を介した IL-6 の刺激伝達系には少なくとも2つのシグナル伝達系 (JAK/STAT 系および Ras/MAPK 系) が関与し、様々な反応を誘導する。

血管内皮増殖因子 (VEGF) は強力な血管作用を有し、IL-6 などの炎症性サイトカインによって誘導され、糖尿病性合併症を誘導する主因子の1つであることが報告されている。実際、糖尿病に罹患した歯周炎患者の歯肉組織では、VEGF の産生が亢進していることが報告されている (Unlu ら, *J Periodontol*, 2003)。しかし、その際の産生をもたらすメカニズムは不明である。

GF は歯周組織を構成する主細胞であり、歯周組織の炎症を制御する重要な役割を担っている。GF において IL-6/sIL-6R は VEGF の産生を誘導することが報告されている (Naruishi ら, *Transplantation*, 2003)。以上の背景より IL-6/sIL-6R が VEGF の発現を介して炎症歯肉における血管新生を誘導し、歯周炎の進行を促進している可能性が示唆される。しかし、高血糖状態を想定した高グルコース状態が IL-6/sIL-6R 誘導性の VEGF 産生に及ぼす影響は不明である。このメカニズムを明らかにすることは糖尿病患者における重度歯周炎の病態を解明する手がかりの1つとなり得ると考える。

よって本研究は、高グルコース状態が GF からの VEGF 産生及び IL-6 のシグナル伝達系に及ぼす影響を調べることを目的とした。

【材料および方法】

1. 細胞培養: 細胞は、研究目的および使用方法を十分に説明して了承を得た上で、全身疾患を有さない患者の臨床的に健康な辺縁歯肉を下顎埋伏智歯抜歯時に採取し、分離・培養した紡錘状を呈する細胞を GF として用いた。培養は、FBS を 10% の割合に含む DMEM を用い、37 °C、5 %炭酸ガス存在下で行った。グルコース濃度は、5.5 mM あるいは 25 mM に設定した。また、浸透圧の影響を考慮しマンニトールを加えた培養系 (5.5 mM グルコース+ 19.5 mM マンニトール) を併せて用いた。なお、本研究では、5-8 継代培養した細胞を実験に供した。
2. 試薬: 刺激因子は、IL-6 および sIL-6R を用いた。刺激濃度は各々 50 ng/ml とした。また p44/42 MAPK 阻害剤として PD98059 および JNK 阻害剤として SP600125 を用いた。濃度は各々 50 μ M とした。

3. RT-PCR 法: gp130, VEGF, β -actin の mRNA の検出は半定量性 RT-PCR 法を用いて検出した。すなわち、GF から TRIZOL LS Reagents を用いて RNA を抽出し、mRNA を逆転写した後、gp130, VEGF, β -actin の cDNA に特異的なプライマーを用いて cDNA を増幅した。増幅した cDNA は、アガロース電気泳動法によって分離し確認した。なお、黒化度は NIH image を用いて解析した。
4. Western Blotting 法: 上記の条件で培養した GF を、細胞溶解液を用いて全細胞タンパクを回収した後、SDS-PAGE にてタンパクを展開し、PVDF 膜に電氣的に転写した。目的とするタンパク質の検出には、一次抗体として抗 gp130 抗体、抗チロシンリン酸化抗体、抗リン酸化 p44/42, 抗リン酸化 p-38, 抗リン酸化 JNK 抗体、抗アクチン抗体を用い、二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ラビット IgG 抗体と反応させ、ECL 蛍光キットを用いて検出した。
5. ゲルシフト法: IL-6/sIL-6R 刺激による AP-1 および CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) の DNA 結合能の動態は、ゲルシフト法を用いて検出した。すなわち、上記の条件で培養した GF を IL-6/sIL-6R で 0-4 時間刺激した後、NE-PER Nuclear and Cytoplasm Extraction Reagents を用いて核内タンパクを分離・抽出した。VEGF プロモーター領域に存在する転写因子 AP-1 および C/EBP の既製 2 本鎖オリゴヌクレオチドの末端を ^{32}P 標識としたものをプローブとし、市販の Gel shift assay system を用いて行った。
6. 培養上清中の VEGF 量の測定: 市販の ELISA キットを用いて定量した。すなわち上記の条件で培養した GF に阻害剤を作用させた後、IL-6/sIL-6R を添加し、0-48 時間培養した後の培養上清に含まれる VEGF 濃度を測定した。
7. 統計処理: 各実験群における有意差検定は、Student's *t*-test を用いて行った。

【結果】

GF において高グルコース状態は、通常状態と比較し、

1. gp130 の発現を増強する (mRNA レベル, タンパク質レベル)。
- さらに IL-6/sIL-6R 刺激すると、
2. gp130 のチロシンリン酸化が増強する。
 3. p44/42 MAPK のリン酸化を増強し、その下流にある核内における C/EBP の活性を誘導する。
 4. VEGF の発現を増強する (mRNA レベル, タンパク質レベル)。そしてその発現は特異的阻害剤で抑制される。またグルコース濃度勾配的にその発現が増強される。
- 一方、
5. 高グルコース状態は、JNK—AP-1 活性に影響をおよぼさないことが示唆された。

【考察】

VEGF の発現は、他の細胞において JNK—AP-1 経路を介し誘導されることが報告されている。GF においても同経路を介し IL-6/sIL-6R 刺激が VEGF を誘導することが報告されている (Naruishi ら, *Transplantation*, 2003)。今回、高グルコース状態は、GF における JNK—AP-1 活性には影響を及ぼさず、IL-6 のシグナル伝達サブユニットである gp130 の発現を増強し、その下流シグナルである p44/42 MAPK—C/EBP の活性を増強し、VEGF の産生を促進した。これらの現象は、糖尿病患者の歯周組織において gp130 を強発現した GF が炎症性サイトカイン IL-6/sIL-6R の刺激を受けることによって VEGF の産生を促進し、さらに血管新生を誘導することで炎症歯肉の破壊を増強している可能性を示唆するものと考ええる。また、IL-6/sIL-6R 存在下でのみ VEGF の産生が促進されたことは、糖尿病患者における歯周炎治療の必要性を示唆するものと考ええる。

【結論】

高グルコース状態の GF は、IL-6/sIL-6R 刺激によって、gp130—p44/42 MAPK—C/EBP を介した経路が活性化され、VEGF の産生を促進している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

歯周炎は糖尿病の第6番目の合併症と提唱されるようになり、全身に対する歯周炎の影響を考察することが重要となってきた。一方、糖尿病は歯周炎の増悪因子として認知されており、その病態は高血糖状態が歯周組織の慢性炎症を悪化させるものとして理解されているが、その詳細なメカニズムは不明である。IL-6などの炎症性サイトカインによって誘導され、強力な血管新生作用を有する血管内皮増殖因子（VEGF）は、糖尿病に罹患した歯周炎患者の歯肉組織において産生されているという報告があった。申請者は、高血糖状態を想定した高グルコース状態において歯肉線維芽細胞からの VEGF 産生に及ぼす IL-6 の影響は不明であるので、このメカニズムを明らかにすることは糖尿病患者における重度歯周炎の病態を解明する手がかりの1つとなり得ると考えている。そして本研究において、高グルコース状態が歯肉線維芽細胞内の IL-6 シグナル伝達系と同細胞からの VEGF 産生に及ぼす影響を明らかにしようとした。

その結果、歯肉線維芽細胞において高グルコース状態は、1) IL-6 のシグナル伝達サブユニットである gp130 の発現を増強し、2) IL-6/sIL-6R 刺激による gp130-p44/42 MAPK-C/EBP を介した経路を活性化し、VEGF の産生を促進する結果を示した。

これらのことから、糖尿病患者の歯周組織では、gp130 を強発現した歯肉線維芽細胞が、炎症性サイトカイン IL-6/sIL-6R の刺激を受けることによって VEGF の産生を増加させ、その結果として血管が新生されるために炎症歯肉の破壊が助長される可能性を示唆し、糖尿病が歯周炎に与える影響のメカニズムの一端を明らかにした点が評価できる。

したがって、本申請論文は学位論文として価値があると認めた。